

# **DER EINFLUSS VON LACTAT AUF DEN MUSKELSTOFFWECHSEL**

**Lactat als ein möglicher Regulationsfaktor für  
den vermehrten Energieverbrauch  
während muskulärer Arbeit**

**Peter Banholzer**

**1973**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Buchborn

# DER EINFLUSS VON LACTAT AUF DEN MUSKELSTOFFWECHSEL

Lactat als ein möglicher Regulationsfaktor für den vermehrten  
Energieverbrauch während muskulärer Arbeit

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Peter Banholzer  
aus Ichenhausen

1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

|                      |                            |
|----------------------|----------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Priv. Doz. Dr. P. Dieterle |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Buchborn      |
| Dekan:               | Prof. Dr. W. Spann         |

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 2. 1973



Meinen Eltern



Herrn Priv.Do. Dr. P. Dieterle möchte ich für die stets freundliche und wohlwollende Unterstützung beim Zustandekommen der Arbeit sowie für die Überlassung des Themas sehr herzlich danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Henner, der in allen technischen Fragen Rat wußte sowie bei Fräulein Dieterle und Herrn P.Wagner für ihre Mitwirkung bei der Durchführung der Experimente.

Fräulein Haag danke ich für ihre freundliche Hilfe beim Anfertigen der Bilder.



## INHALTSVERZEICHNIS

|                             | <u>Seite</u> |
|-----------------------------|--------------|
| Liste der Abkürzungen ..... | 4            |
| EINLEITUNG .....            | 5            |
| VERSUCHSANORDNUNG .....     | 6            |
| <u>MESSMETHODEN</u>         |              |
| Glucosebestimmung .....     | 8            |
| Lactatbestimmung .....      | 10           |
| Bestimmung der NFS .....    | 12           |
| Glyzerinbestimmung .....    | 14           |
| Glykogenbestimmung .....    | 15           |
| <u>ERGEBNISSE</u>           |              |
| Lipidstoffwechsel .....     | 17           |
| Zuckerstoffwechsel .....    | 18           |
| ABBILDUNGEN .....           | 19           |
| TABELLEN .....              | 23           |
| DISKUSSION .....            | 30           |
| ZUSAMMENFASSUNG .....       | 37           |
| LITERATURVERZEICHNIS .....  | 38           |

Liste der Abkürzungen

|            |                                      |
|------------|--------------------------------------|
| ATP        | Adenosintriphosphat                  |
| FI         | Fructoseisomerase                    |
| GK         | Glycerokinase                        |
| HK         | Hexokinase                           |
| KBR-Puffer | Krebs-Bikarbonat-Ringer - Puffer     |
| LDH        | Lactatdehydrogenase                  |
| NADP       | Nicotinamidadenindinucleotidphosphat |
| NFS        | Nicht Veresterte Fettsäuren          |
| s          | Standarddeviation                    |
| S.E.       | Standarderror                        |
| PEP        | Phosphoenolpyruvat                   |
| PFK        | Phosphofructokinase                  |
| PK         | Pyruvatkinase                        |
| VK         | Variationskoeffizient                |

## EINLEITUNG

Während einer Muskelarbeit kommt es zu einem Anstieg der arteriellen Glyzerinkonzentration und zu einem initialen arteriellen NFS-Abfall in den ersten 5 min, der dann von einem arteriellen Anstieg gefolgt ist.

Es stellt sich die Frage, ob dieser NFS-Abfall durch eine vermehrte Aufnahme in die Muskulatur oder durch eine verminderte Bereitstellung aus der Lipolyse bedingt ist.

Es ist bekannt, daß die NFS-Aufnahme in das Gewebe gemäß dem Massenwirkungsgesetz eine direkte Funktion der NFS-Spiegel ist (22, 52).

Trotz des initialen NFS-Sturzes konnte von vielen Untersuchern eine vermehrte Aufnahme der NFS in die Muskulatur beobachtet werden (10, 20, 22, 28), so daß der NFS-Abfall demnach auf eine vermehrte Aufnahme schließen läßt.

Andererseits haben schon ISSEKUTZ et al. 1962 auf die negative Korrelation von Lactatproduktion und arteriellem NFS-Sturz hingewiesen und konnten in diesem Zusammenhang durch Lactatinfusionen am ruhenden Hund eine Hemmung der Lipolyse wahrscheinlich machen.

Am Fettgewebe in vitro hemmt Milchsäure dosisabhängig die Freisetzung von Glyzerin und NFS (16).

Der beobachtete NFS-Sturz wäre deshalb auch z.T. auf eine antilipolytische Wirkung der bei muskulärer Arbeit enorm vermehrten Milchsäure auf das Fettgewebe zu erklären.

Wegen der zum Teil widersprüchlichen Befunde und um die komplexen Verhältnisse in vivo zu umgehen, haben wir im vitro-System am ruhenden Muskel untersucht, welchen Einfluß die Milchsäure auf den Muskelstoffwechsel hat.

## VERSUCHSANORDNUNG

Pro Versuchsansatz wurden 6 Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 150 bis 200 g dekapitiert. Die Tiere waren vorher ad libitum mit Altromin-Körnern gefüttert worden. Die Tötung fand in allen Fällen zwischen 8<sup>30</sup> und 9<sup>30</sup> morgens statt. Sofort danach wurden die Zwerchfellhälften entnommen und in ein vorbereitetes Gefäß gegeben, das einen Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer mit einem pH von 7,3 - 7,4 enthielt. Nach einer Vorinkubation, die 30 Minuten dauerte, verteilten wir die Zwerchfellhälften auf 12 Warburg-Inkubationsgefäße, in denen sich je 5 ml des KBR-Puffers befanden. Dieser Puffer enthielt zusätzlich Rinder-Albumin in einer Konzentration von 2 g%. Vier der Gefäße blieben ohne Lactat. Zwei weitere Gruppen zu je vier Gefäßen wurden 50 bzw. 100 mg% Lactat zugefügt. Wir achteten streng darauf, daß der pH in jedem Falle auf dem Wert 7,4 gehalten wurde. Titriert wurde mit 18 n NaOH unter Zuhilfenahme eines pH-Meters.

Nach Begasung mit Karbogen erfolgte die Inkubation. Die Dauer der Inkubation betrug 3 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 37° C und einer Schüttelfrequenz von 100 - 120/min.

Nach Entnahme der Muskelstücke wurde der Gehalt des Puffers an Glycerin, NFS, Lactat und Glucose bestimmt. Aus der Differenz des Gehalts vor und nach der Inkubation schlossen wir auf Substrataufnahme bzw. -abgabe der einzelnen Muskelstücke während der Dauer des Versuchs. Jede Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Da die Zwerchfelle aus technischen Gründen nicht exakt gleich groß waren, bezogen wir die Konzentrationsänderungen auf je 1000 mg Muskelgewicht, um eine bessere Vergleichsbasis zu haben. Die Muskelgewichte lagen jeweils zwischen 120 und 150 mg.

In einer zweiten Versuchsreihe enthielt das Puffermedium außerdem Glucose in einer Konzentration von 200 mg%. Hier benötigten wir pro Versuchsansatz 12 Ratten, da wir zusätzlich den Glycogengehalt je einer Zwerchfellhälfte vor und nach der Inkubation bestimmten.

Da die Ausgangswerte zum Teil sehr voneinander abwichen, die Differenzen aber, die uns vor allem interessierten, relativ gute Übereinstim-

mung zeigten, bestimmten wir die Signifikanz einer mittleren Differenz nach der Formel

$$t = \frac{\bar{x} \text{ Differenzen}}{SE}$$

Dadurch wird verhindert, daß die große Variabilität der Ausgangswerte unerwünscht als Fehler in die Rechnung eingeht.

In den Tabellen sind deshalb die Mittelwerte  $\bar{x}$  der Differenzen angegeben, nicht dagegen die Mittelwerte der Substratkonzentrationen im lactathaltigen Medium (Spalte II und III), da sie nicht in die Signifikanzrechnung eingehen.

## MESSMETHODEN

Zur Messung von Glucose und Lactat mußte der KBR-Puffer zunächst wie folgt aufbereitet werden:

3 ml 4%ige Perchlorsäure wurden in Rundzentrifugengläser pipettiert, 1 ml des zu bestimmenden KBR-Puffers zugegeben und gut geschüttelt. Der Überstand wurde mit 5 n KOH auf ca. pH 5 und durch Zugabe von Kaliumhydrogenkarbonat auf ca. pH 7 gebracht mittels Indikatorpapier. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgegossen. Die Proben sind nun zur Messung von Glucose und Lactat gebrauchsfertig.

### Bestimmung von Glucose

Glucose wurde enzymatisch mittels der Hexokinasereaktion bestimmt (47). Verwendet wurde hierzu die Boehringer Test-Kombination TC-X-II (9).

Das Prinzip der Hexokinase-Reaktion beruht darauf, daß Glucose in Anwesenheit von ATP unter Wirkung der Hexokinase in 6-Stellung phosphoryliert wird. Dadurch entsteht Glucose-6-Phosphat, das mittels Glucose-6-Phosphatdehydrogenase in 1-Stellung oxidiert wird. Der bei dieser Reaktion frei werdende Wasserstoff wird auf NADP übertragen; es entsteht NADPH. Der Zuwachs an NADPH wird photometrisch gemessen. Die Reaktion verläuft stöchiometrisch, da pro Mol Glucose ein Mol NADPH entsteht. Die Extinktionsänderung aufgrund der Zunahme an NADPH ist also gleichzusetzen der Menge oxidierteter Glucose.



Die Reaktion ist streng spezifisch. Störend eingehen kann nur Fructose unter Anwesenheit von Fructoseisomerase, das die Fructose in Glucose überführen kann. Da wir nur hochgereinigte Enzyme der Fa. Boehringer verwendeten, konnten wir sicher sein, daß FI nicht vorhanden war.

## R e a g e n z i e n

### Trampufferlösung Nr. 1

18,6 g Triäthanolamin Hydrochlorid auf ca. 450 ml Aqua bidest.

406,6 mg  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Mit 5n-KOH auf pH 7,5 einstellen mittels pH-Meter.

Danach die Lösung mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen.

(Bei 4° C etwa 1 Monat haltbar.)

### Lösung Nr. 2

40 ml Trampuffer Nr. 1

24,2 mg ATP (Adenosin-5-triphosphat)

30 mg NADP (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat)

(Bei 4° C ca. 1 Woche haltbar.)

### Lösung Nr. 3

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 1 mg/1 ml und Hexokinase 100 mg/  
10 ml im Verhältnis 1 : 1.

## A r b e i t s g a n g

In Halbmikroküvetten nacheinander einpipettieren:

0,5 ml Lösung Nr. 2

0,05 ml Probe (bei Leerwert Aqua bidest.)

mischen und messen ergibt  $E_1$ .

Dann 0,005 ml Lösung Nr. 3 zugeben, mischen und warten bis die Reaktion abgelaufen ist. Das Ende der Reaktion ist am Schreiber ersichtlich. Messung ergibt  $E_2$ .

## B e r e c h n u n g

Die Berechnung aller enzymatisch bestimmten Stoffwechselmetaboliten erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

$$E_2 - E_1 = \epsilon \times c \times d$$

$\epsilon$ : Extinktionskoeffizient

c: Konzentration der untersuchten Probe

d: Schichtdicke der Küvette

Berücksichtigt man noch das Testvolumen (TV), das Volumen der eingesetzten Probe (V) und die bei der Enteiweißung und der Titration entstehende Vorverdünnung, so ergibt sich folgende Grundformel:

$$c \text{ (mg\%)} = \frac{((E_2 - E_1) - L) \times \text{Ges.Fl.}}{V_{\text{Puffer}}} \times \frac{TV \times M \times 100}{\epsilon \times V \times 1000}$$

TV: Testvolumen

V: Volumen der eingesetzten Probe

$V_{\text{Puffer}}$ : Volumen des verwendeten KBR-Puffers

Ges.Fl.: Gesamtflüssigkeit

M: Molgewicht

L: Extinktion des Leerwerts

Bei jeder Messung lief ein Leerwert (L) mit, dem anstatt der aufbereiteten Probe die entsprechende Menge Aqua bidest. zugegeben wurde. Die so ermittelte Eigenextinktion der Lösung muß jeweils von  $(E_2 - E_1)$  abgezogen werden, um die von Glucose bzw. Lactat verursachte Extinktionsänderung zu erhalten.

Im Falle der Glucosebestimmung ergab sich für die von uns gewählten Bedingungen folgende einfache Beziehung:

$$c \text{ (mg\%)} = (E_2 - E_1 - L) \times 139,105$$

Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. In Vorversuchen ermittelten wir die Fehlerbreite unserer Methoden, die für Glucose nach einiger Übung bei einem VK von 1,2 liegt. Dieser Wert entspricht bei einem Ausgangswert von 200 mg% Glucose 2,4 mg%. Die Meßgenauigkeit reicht von 0 mg% bis 300 mg% und reichte somit für unsere Versuche voll aus.

### Lactatbestimmung

Lactat wurde enzymatisch in Anlehnung an die von HOHORST (32) angegebene Methode bestimmt.

Es handelt sich hierbei im wesentlichen um folgende Reaktion:



Mit dem Ablauf der Reaktion erhält man eine Zunahme an NADH. Da pro Mol Lactat ein Mol NADH entsteht, kann man aus der Zunahme von NADH die Konzentration des Lactat berechnen.

### R e a g e n z i e n

#### Stammlösung Nr. 1

150 g Glycin  
4 g Titriplex III  
104 g Hydraziniumsulfat  
auf 1000 ml Aqua bidest.

#### Lactat-Puffer-Lösung Nr. 2

15 ml Lactat-Stammlösung Nr. 1  
15 ml 2 normale NaOH ergibt einen pH von 9,5. Nachmessen mit Indikatorpapier.  
27 ml von dem Gemisch pH 9,5 und 24 ml Aqua bidest. ergibt Lactat-Puffer.

#### Lösung Nr. 3

265 mg NAD- $\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinucleotid auf 4 ml Aqua bidest.

### A r b e i t s g a n g

Nacheinander in Küvetten einpipettieren:

1,7 ml Lactat-Puffer-Lösung Nr. 1

0,05 ml NAD-Lösung Nr. 3

0,05 ml Probe (Herstellung siehe bei Glucosebestimmung).

Mischen mit Rührkrücken. Messen ergibt  $E_1$ .

0,01 ml LDH (Boehringer 15 371 ELAC) Messung ergibt  $E_2$ .

### B e r e c h n u n g

(Grundlagen siehe Glucosebestimmung)

$$c \text{ (mg\%)} = \frac{((E_2 - E_1) - L) \times \text{Ges.Fl.}}{V_{\text{Puffer}}} \times \frac{TV \times M \times 100}{\epsilon \times V \times 1000}$$

Unter unseren Versuchsbedingungen ergab sich folgende einfache Beziehung:

$$c \text{ (mg\%)} = (E_2 - E_1 - L) \times 226,82.$$

### Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren

Die Bestimmung der NFS im KBR-Puffer erfolgte nach einer Modifikation (15) der von DUNCOMBE (17) angegebenen Methode. Bei dieser Methode werden die NFS als Kupfersalze mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Kupferseifen werden mit Diäthylthiocarbaminat in einen Kupferkomplex überführt und kolorimetrisch bestimmt.

### R e a g e n z i e n

1. Chloroform p.a.
2. Kupferreagenz
  - a)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ; 6,45 % Lösung
  - b) 9 Teile 1-molares Triäthanolamin + 1 Teil 1-normale Essigsäurea) und b) werden im Verhältnis 1 : 1 gemischt.
3. Natrium-Diäthylthiocarbaminat ( $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NNaS}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ )  
Davon wird eine 0,1 % Lösung in sekundärem Butanol hergestellt.  
Lösung 2 und 3 müssen im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt und jede Woche erneuert werden.

## Durchführung

Nacheinander pipettiert man in je ein Schliffreagenzglas 5 ml Chloroform (bzw. in 5 ml Chloroform gelösten Palmitinsäurestandard) und 2,5 ml Kupferreagenz. Nach Zugabe von 0,5 ml KBR-Puffer wird das Glas mit einem Kunststoffstopfen verschlossen und in einer dreidimensionalen Schüttelmaschine geschüttelt. Die volle Ausbeute erhält man nach 30 Minuten Schüttelzeit (15). Anschließend wird das Gemisch 10 Minuten lang mit 3000 g zentrifugiert. Dabei bilden sich zwei Phasen, die durch eine Eiweißschicht voneinander getrennt sind. Die oberhalb der Eiweißschicht befindliche wäßrige Kupferphase muß sehr vorsichtig abgesaugt werden. Wir verwendeten dazu eine fein ausgezogene Polyäthylenkanüle, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war. Nachdem die Glaswand sorgfältigst von Kupferspuren gereinigt ist, muß die Eiweißschicht ebenfalls vorsichtig abgesaugt werden. Es dürfen dabei keine Kupferspuren in die unten befindliche Phase eingebracht werden. In dieser unteren Phase befinden sich die in Chloroform gelösten Kupfersalze der NFS. 3 ml von diesem Gemisch werden abpipettiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Diäthylthiocarbaminat schüttelt man kurz mit der Hand und mißt sofort den entstandenen Kupferkomplex in einem Farbkolorimeter. Gemessen wird gegen einen Leerwert, der keinen KBR-Puffer enthält und während der ganzen Bestimmung mitläuft. Als Standard verwendeten wir einen Palmitinsäurestandard, der eine genau definierte Menge Palmitinsäure enthält. Dieser Standard läuft ebenfalls während der ganzen Bestimmung mit.

Die Berechnung erfolgt nach dem Dreisatz:

$$\text{Extinktion(Probe)} \frac{\mu\text{val/l (Standard)}}{\text{Extinktion(Standard)}} \cdot 10 = \mu\text{val/l NFS}$$

Der Faktor 10 ergibt sich daraus, daß man eine 10-fache Menge des Standards mit der eingesetzten KBR-Puffermenge vergleicht. Man verwendet für den Standard nicht 0,5 ml, wie bei der KBR-Pufferprobe, sondern 5,0 ml.

Mit der Methode erfaßt man nur die höhermolekularen NFS; dagegen werden die kurzkettigen NFS nicht mitbestimmt. Da physiologisch nur die langkettigen NFS eine Rolle spielen, besteht keine Gefahr, daß man fälschlicherweise zu hohe Werte bestimmt.

In Vorversuchen wurde ein Variationskoeffizient von 2,7 % ermittelt. Demnach beträgt die meßtechnische Schwankung bei einem Ausgangswert von 400  $\mu\text{val/l}$  nur 10,8  $\mu\text{val/l}$ .

### Bestimmung des Glyzerin

Die Glyzerinbestimmung wurde enzymatisch nach den Angaben von KREUTZ (43) durchgeführt.

### R e a g e n z i e n

#### 1. Zusammensetzung des Puffers

- a) Triäthanolamin-Hydrochlorid 0,3 molar
- b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,06 molar
- c)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,3 molar

Wird diese Zusammensetzung gewählt, so ergibt sich der pH-Wert von 7,5.

#### 2. Enzymlösung I

Gemisch aus NADH, PEP, ATP; diese werden in 5 %iger  $\text{NaHCO}_3$  gelöst.

#### 3. Enzymlösung II

Gemisch aus PK und LDH.

#### 4. Glycerokinase

Bei der enzymatischen Glyzerinbestimmung handelt es sich um drei hintereinandergeschaltete Reaktionen:

- a)  $\text{Glyzerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glyzerophosphat} + \text{ADP}$
- b)  $\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$
- c)  $\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$

Da alle drei hintereinandergeschalteten Reaktionen Mol pro Mol verlaufen, entspricht die Abnahme von NADH der Glyzerinkonzentration. Glyzerophosphat, das im KBR-Puffer vorhanden ist, kann die Ergebnisse nicht verfälschen, da es, wie ersichtlich, nicht in die Reaktion ein-

geht. Dagegen stört im Puffer vorhandenes Pyruvat die Reaktion empfindlich. Man muß daher erst die Pyruvatreaktion ablaufen lassen, die als Schleichreaktion verläuft. Das Ende dieser Reaktion stellen wir mit Hilfe eines an das Photometer gekoppelten Schreibers fest. Erst wenn die Schleichreaktion abgelaufen ist, beginnen wir mit der eigentlichen Messung.

### D u r c h f ü h r u n g

Zu 2,3 ml Puffer gaben wir nacheinander 0,5 ml KBR-Puffer, 0,2 ml der Enzymlösung I und 0,03 ml der Enzymlösung II. Danach wurde mit kleinen Kunststoffkrücken gut durchmischt. Nach Ende des Leerschleichts wurde bei 25° C die Extinktion  $E_1$  gemessen. Zum Starten der Reaktion wurde GK zugegeben. Es wurde erneut durchmischt. Nach etwa 5 min war die Reaktion abgelaufen.  $E_2$  konnte gemessen werden. Aus  $E_1 - E_2$  läßt sich die Menge des Glyzerins berechnen.

Die Berechnung erfolgt wiederum nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Für die von uns gewählten Bedingungen ergibt sich somit folgende Beziehung:

$$\mu\text{mol/ml (Glyzerin)} = (E_1 - E_2) \cdot \frac{\text{Testvolumen}}{\epsilon \cdot d \cdot v}$$

$$\mu\text{mol/ml (Glyzerin)} = (E_1 - E_2) \cdot 1,0016$$

Der Faktor 1,0016 weicht so geringfügig von 1,0 ab, daß man ihn praktisch vernachlässigen kann. Die Differenz  $E_1 - E_2$  ist somit gleich der Glyzerinkonzentration zu setzen.

### Glykogenbestimmung

Es wurde bestimmt nach der Methode von A.KEMP und Adrienne j.M. Kits van Heijningen (40).

## R e a g e n z i e n

### Lösung I zur Enteiweißung

100 mg  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$  werden in 100 ml 5 %iger Trichloressigsäure (TCE) gelöst. Diese Lösung ist kurz vor der Bestimmung zuzubereiten.

95 - 97 %ige Schwefelsäure (Merck).

### Prinzip

Lösung I löst Glykogen aus dem Gewebe. Glucose wird ausgewaschen.

$\text{H}_2\text{SO}_4$  spaltet Glykogen in Glucose. Diese Glucose wird gemessen.

### D u r c h f ü h r u n g

1. Muskelgewebe in 5 ml Lösung I in 10 ml Zentrifugengläser geben.
2. Gläser vor und nach der Gewebeeinlage wiegen.
3. Flüssigkeitsspiegel markieren.
4. Glas abdecken und 15 min in siedendes Wasserbad ( $100^\circ \text{C}$ ) stellen.
5. Flüssigkeit bis zur Marke auffüllen mit Lösung I.
6. 5 min bei 3000 U/min zentrifugieren.
7. pH der Proben auf ca. 7 bringen mit Kaliumbikarbonat.
8. 5 min zentrifugieren bei 3000 U/min.
9. 1 ml des klaren Überstandes in ein Rundzentrifugenglas pipettieren.
10. 3 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  werden dazugegeben.
11. Mit Glasstab gut umrühren (bis Schlieren verschwinden).
12. Anschließend 6,5 min in siedendem Wasserbad kochen, in Eisbad stellen.
13. Messen im Photometer bei 546 mμ.

### B e r e c h n u n g

Nach Lambert-Beer:

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

$$c = \frac{E \cdot \text{Verdünnung (TCE)} \cdot \text{Molgew.} \cdot 100}{\epsilon \cdot \text{Muskelgew.} \cdot \text{Verdünnung (H}_2\text{SO}_4) \cdot d \cdot 100}$$

$$c = \frac{\Delta E}{\text{Muskelgewicht}} \cdot 80,4765$$

## ERGEBNISSE

### Lipidstoffwechsel

Die basale Lipolyse im lactatfreien Medium, gemessen an der Glyzerinfreisetzung, war mit und ohne Glucosezusatz etwa gleich. Wir fanden nach dreistündiger Inkubation im lactatfreien KBR-Puffer einen Anstieg der Glyzerinkonzentration um  $604,7 \pm 203,56 \mu\text{Mol/l}$  ohne, und um  $614,0 \pm 102,33 \mu\text{Mol}$  ( $\bar{x} \pm s$ ) mit Glucosezusatz.

Die Fettsäurefreisetzung nach 3 Stunden betrug  $248,1 \pm 297,0 \mu\text{Val/l}$  im glucosefreien und  $85,8071 \pm 159,1 \mu\text{Val/l}$  ( $\bar{x} \pm s$ ).

Nach Zusatz von Milchsäure zum Inkubationsmedium wurde die Basallipolyse deutlich stimuliert. In Abb. II und III ist der Einfluß verschiedener Lactatkonzentrationen im glucosefreien und glucosehaltigen Medium dargestellt. Die basale Lipolyse wurde mit 0 bezeichnet. Änderungen sind in  $\mu\text{mol/l} \cdot 3 \text{ h}$  angegeben und beziehen sich auf 1 g Muskelgewicht.

Man erkennt eine gegenüber der basalen Lipolyse signifikant vermehrte Freisetzung von Glyzerin, die bereits deutlich bei einer Lactatkonzentration von 50 mg% ausgeprägt war und sich durch Erhöhung der Lactatkonzentration auf 100 mg% nicht wesentlich steigern ließ.

Die lactatbedingte Lipolysesteigerung machte im Mittel etwa 17 % der Basallipolyse (mit Glucose 21 %) aus. Die Verhältnisse waren im glucosefreien und glucosehaltigen Medium nahezu identisch.

Trotz der signifikant vermehrten Glyzerinfreisetzung erschienen die dabei frei werdenden Fettsäuren nicht im Medium. Bei 100 mg% Lactatkonzentration wurden sogar trotz signifikant vermehrter Glyzerinabgabe gleichzeitig signifikant vermehrt freie Fettsäuren in die Muskulatur aufgenommen ( $p < 0,01$ ).

Das Ergebnis erscheint um so bedeutsamer, wenn man beachtet, daß pro entstehendem Mol Glyzerin 3 Mol NFS frei werden müssen. Das heißt, daß im glucosefreien Medium über 80 % der entstehenden NFS zurückgehalten werden. Im glucoschaltigen Medium waren es sogar über 90 % (Abb. I).

### Zuckerstoffwechsel

In unserer ersten Versuchsreihe ohne Glucosezusatz zum Medium fanden sich auch am Ende der Inkubationszeit keine meßbaren Glucosemengen im Puffer.

In der zweiten Serie betrug die basale Glucoseaufnahme nach 3 Stunden  $38,80 \pm 19,4$  mg% ( $\bar{x} \pm 1$  SE) pro 1 g Muskelgewicht. Durch Zugabe von Lactat zum Inkubationsmedium wurde die Glucoseaufnahme um  $25,1 \pm 14,9$  mg% bei 50 mg% Lactat und um  $27,2 \pm 19,7$  mg% ( $\bar{x} \pm$  SE) bei 100 mg% Lactat gesteigert (siehe Tab. V).

In Abb. IV ist die basale Glucoseaufnahme als 0 angegeben. Änderungen der Glucosekonzentration sind in mg%/3 h bezogen auf 1 g Muskelgewicht eingezeichnet. Eine signifikante Mehraufnahme in den Muskel ergab sich bei der geringen Anzahl der Versuche nicht.

Dagegen kam es unter Lactateinfluß zu einer signifikanten Neusynthese von Glykogen (Abb. V und Tab. VI). Mehrfache Kontrollen hatten ergeben, daß die Zwerchfelle nach der 30 Minuten dauernden Vorinkubation praktisch glykogenfrei waren. Bei Versuchsende konnten wir bei 50 mg% Lactat einen Glykogenzuwachs von  $0,2258 \pm 0,0744$  mg% ( $\bar{x} \pm$  SE) bei 100 mg% Lactat eine Zunahme von  $0,3275 \pm 0,1113$  mg% ( $\bar{x} \pm$  SE) messen (siehe Tab. VI).

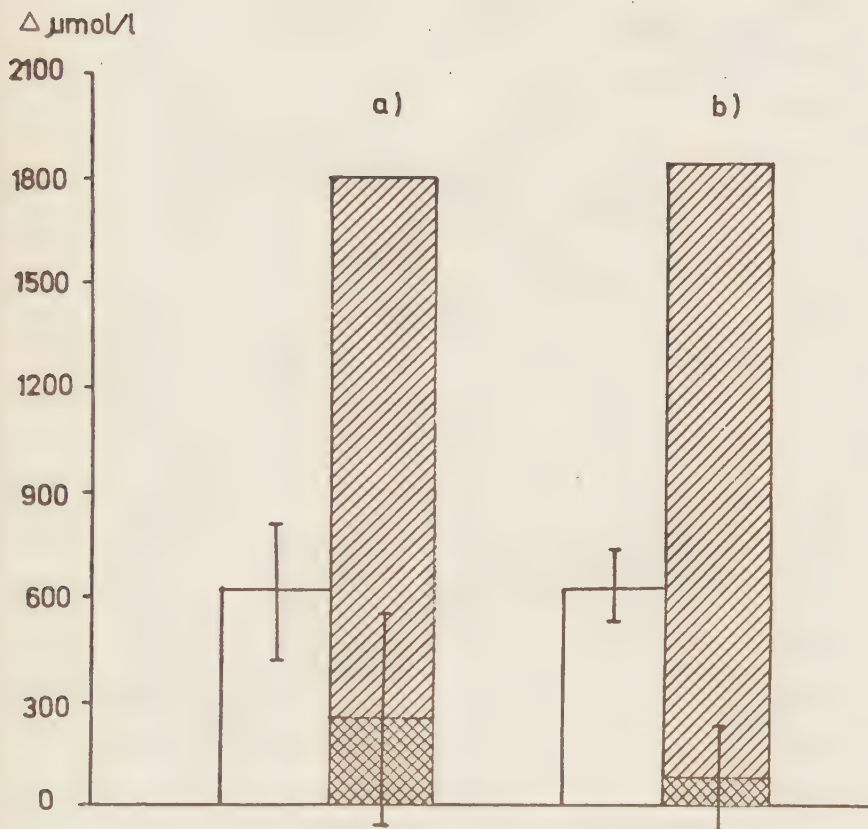


Abb. I:

Basale Lipolyse, gemessen an der Freisetzung von Glycerin und NFS nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen KBR-Puffer (a) und unter Zusatz von 200 mg% Glucose (b), bezogen auf 1 g Muskel.

Bei nahezu identischen Glycerinproduktionen wurden bei Zusatz von Glucose weniger NFS freigesetzt. Trotzdem pro Mol entstandenem Glycerin (weiße Säule) 3 Mol NFS frei geworden sein müssen, wurden im Medium nur wenig NFS abgegeben (karierte Säule). Der größte Teil wurde im Muskel zurückbehalten (schraffierte Säule).

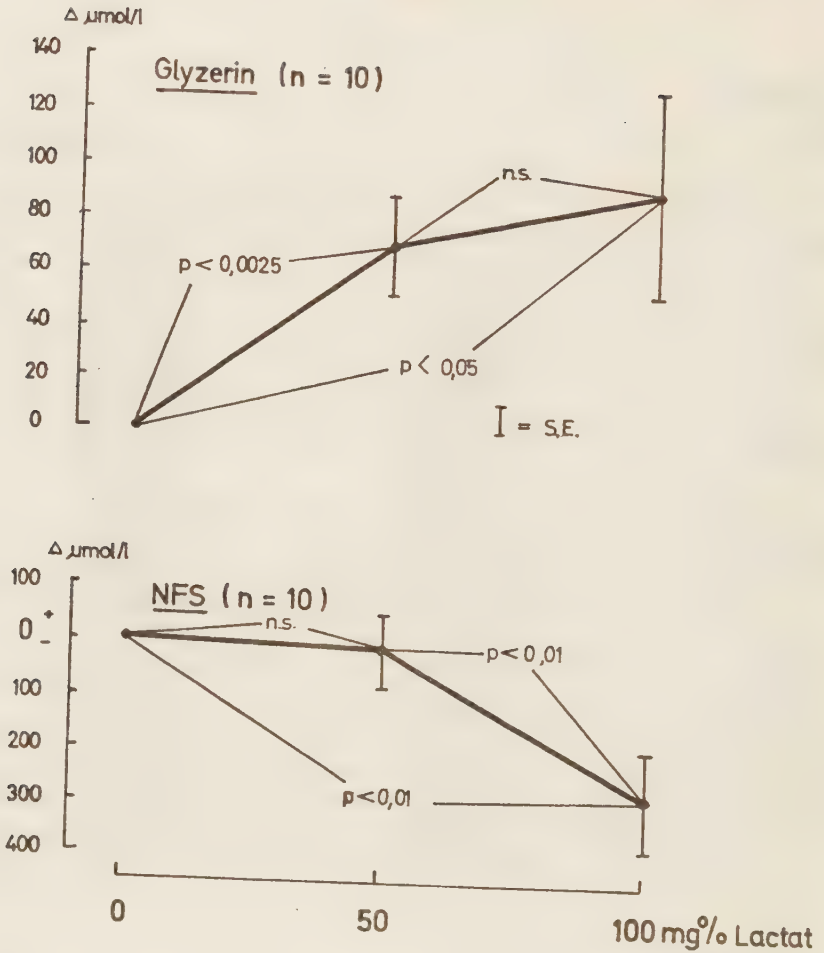


Abb. II:

Einfluß von steigenden Mengen Lactat zum albuminhaltigen KBR-Puffer auf den Fettstoffwechsel inkubierter Rattenzwerchfellhälfen.

Die basale Lipolyse wurde als 0 eingesetzt und die Veränderungen ( $\Delta$ ) durch Lactatzusatz als  $\mu\text{Mol/g} \cdot 3\text{h}$  angegeben (siehe Tab. I u. II).

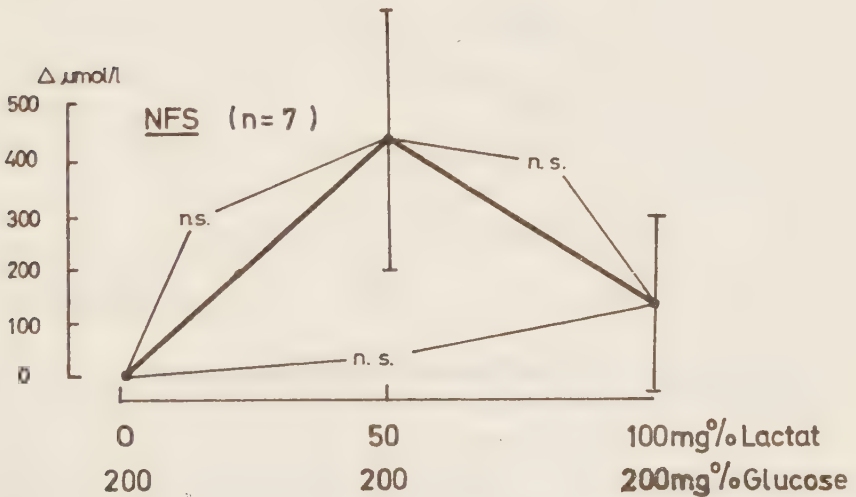
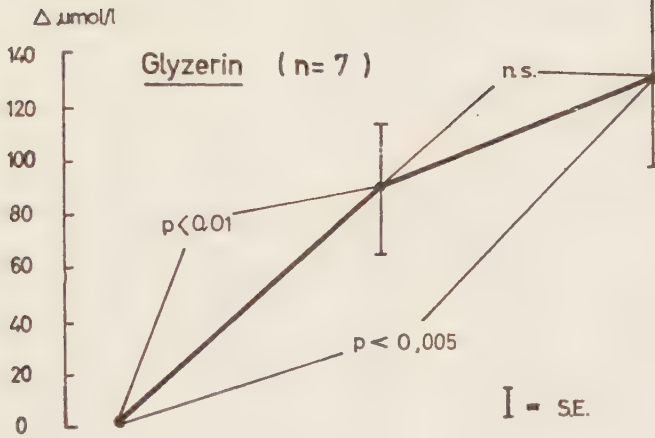


Abb. III:

Einfluß steigender Mengen von Lactat zum albuminhaltigen mit 200 mg% Glucose angereicherten KBR-Puffer auf den Fettstoffwechsel inkubierter Rattenzwerchfelhälfen.

Die basale Lipolyse wurde als 0 eingesetzt und die Veränderungen ( $\Delta$ ) durch Lactatzusatz als  $\mu\text{mol/g}\cdot 3\text{h}$  angegeben (siehe Tab. III u. IV).

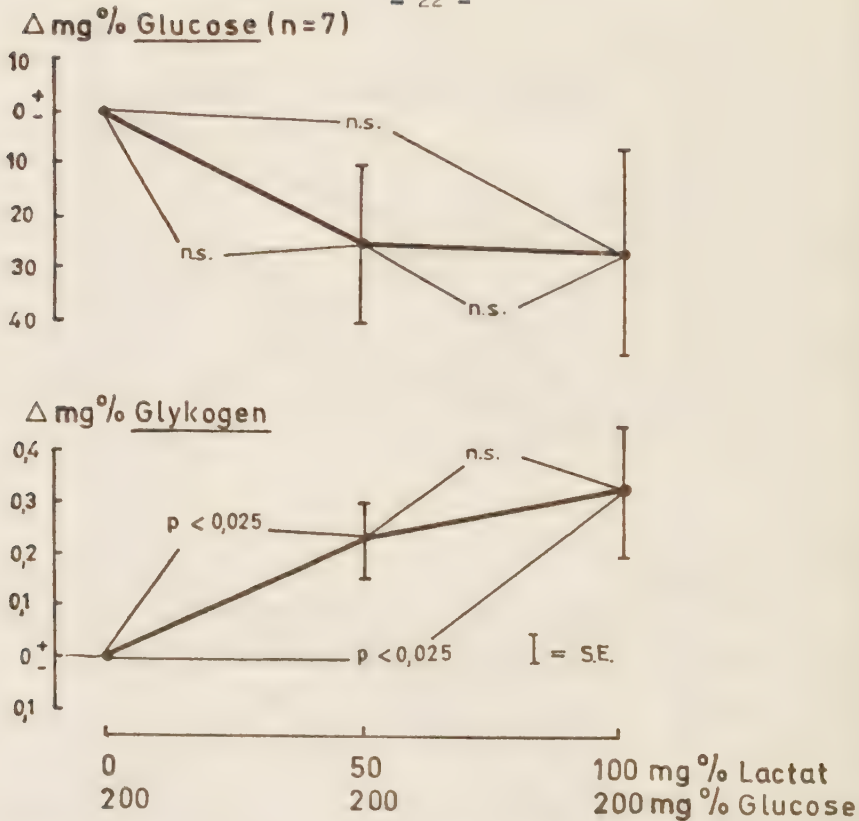


Abb. IV (oben): Einfluß von steigenden Mengen von Lactat auf den Glucosestoffwechsel inkubierter Rattenzwerchfelhälfen (s. Tab. V)

Der Glucosegehalt des Mediums nach 3-stündiger Inkubation im lactatfreien Medium wurde als 0 eingesetzt. Die Änderungen des Glucosegehaltes des Mediums ( $\Delta$ ) durch Lactatzusatz in steigenden Mengen (50 mg% bzw. 100 mg%) sind in mg%/g·3h angegeben.

Abb. V (unten): Einfluß steigender Mengen Lactat zum albuminhaltigen mit 200 mg% Glucose angereicherten KBR-Puffer, auf den Glykogengehalt von Rattenzwerchfelhälfen nach 3-stündiger Inkubation (s. Tab. VI)

Der Glykogengehalt der Muskelstücke im lactatfreien Medium nach 3-stündiger Inkubation wurde als 0 eingesetzt. Die durch steigende Mengen Lactat bedingten Änderungen sind in mg%/g·3h angegeben.

| I         | II      | III    | $\Delta_1$ | $\Delta_2$ | $\Delta$ |
|-----------|---------|--------|------------|------------|----------|
| 447,50    | 401,20  | 214,0  | - 46,30    | -187,20    | -233,50  |
| - 11,00   | -134,75 | - 54,0 | -123,75    | 80,75      | - 43,00  |
| 141,30    | 99,00   | 84,3   | - 42,30    | - 14,70    | - 57,00  |
| 749,75    | 1000,00 | 395,2  | 251,00     | -605,55    | -354,55  |
| 226,00    | -214,30 | -258,0 | -440,30    | - 43,70    | -484,00  |
| 294,30    | 227,30  | -683,3 | - 67,00    | -910,60    | -977,60  |
| -101,50   | 165,50  | -145,8 | 267,00     | -311,30    | - 44,30  |
| -261,60   | - 9,60  | -214,0 | 252,00     | -204,40    | 47,60    |
| 534,00    | 487,30  | 204,3  | - 46,70    | -283,00    | -329,70  |
| 462,30    | 388,80  | 16,3   | - 73,50    | -372,50    | -446,00  |
| $\bar{x}$ | 248,1   |        | 7,0        | 285,2      | 291,2    |
| s         | 297,0   |        | 216,75     | 309,6      | 304,1    |
| SE        |         |        | 68,5       | 98,0       | 96,1     |
| t         |         |        | 0,116      | 2,91       | 3,03     |
|           |         |        | n.s.       | p < 0,01   | p < 0,01 |

Tab. I:

Verhalten der NFS nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen KBR-Puffer bei verschiedenen Lactatkonzentrationen

Die Zahlen sind Mittelwerte aus je einem Versuchsansatz mit je 12 Zwerchfellhälften. Spalte I, II und III zeigen die Zunahme (positive Zahlen) bzw. Abnahme (negative Zahlen) der NFS in  $\mu\text{mol/l}$  im lactatfreien (Spalte I) und im lactathaltigen Medium (Spalte II mit 50 mg%, Spalte III mit 100 mg% Lactat).

$\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  und  $\Delta$  sind die Differenzen II - I, III - II und III - I und bedeuten die durch Lactatzusatz bedingten Veränderungen.

Zu der mittleren Differenz  $\bar{x}$  und den Standardabweichungen siehe Kapitel Versuchsanordnung.

| I         | II      | III    | $\Delta_1$   | $\Delta_2$ | $\Delta$   |
|-----------|---------|--------|--------------|------------|------------|
| 380,25    | 388,75  | 392,0  | 8,50         | 3,25       | 11,75      |
| 407,50    | 452,25  | 723,0  | 44,75        | 270,75     | 315,50     |
| 995,00    | 1122,50 | 1100,0 | 127,50       | - 22,50    | 105,00     |
| 300,20    | 458,30  | 347,0  | 158,10       | -111,30    | 46,80      |
| 509,00    | 561,00  | 667,6  | 52,00        | 106,60     | 158,60     |
| 640,00    | 808,00  | 843,3  | 168,00       | 35,30      | 203,30     |
| 645,00    | 723,00  | 585,0  | 78,00        | -138,00    | - 60,00    |
| 611,00    | 632,00  | 610,3  | 20,70        | - 22,00    | - 1,30     |
| 688,00    | 745,60  | 854,6  | 57,30        | 109,00     | 166,30     |
| 870,00    | 897,00  | 804,0  | 27,00        | - 95,00    | - 66,00    |
| $\bar{x}$ | 604,7   |        | 74,2         | 13,6       | 88,0       |
| s         | 203,56  |        | 57,6         | 123,6      | 123,3      |
| SE        |         |        | 18,2         | 39,1       | 39,1       |
| t         |         |        | 4,0769       | 0,34782    | 2,2506     |
|           |         |        | $p < 0,0025$ | n.s.       | $p < 0,05$ |

Tab. II:

Glyzerinkonzentrationen nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen KBR-Puffer bei verschiedenen Lactatkonzentrationen.

Die Glyzerinkonzentration ist in  $\mu\text{Mol/l}$  angegeben. Erklärung der einzelnen Spalten wie Tab. I.

| I         | II       | III      | $\Delta_1$ | $\Delta_2$ | $\Delta$ |
|-----------|----------|----------|------------|------------|----------|
| -185,25   | 130,25   | - 360,00 | 315,50     | -490,25    | - 172,75 |
| 34,40     | 886,00   | 169,75   | 851,60     | -716,25    | 135,35   |
| 202,75    | 571,00   | 151,25   | 368,25     | -419,75    | - 51,50  |
| 108,50    | 218,25   | 685,75   | 109,75     | 467,50     | 577,25   |
| 158,25    | - 215,00 | 70,25    | - 393,25   | 285,25     | - 88,00  |
| - 53,25   | 56,75    | - 368,00 | 110,00     | -424,75    | - 314,75 |
| 335,25    | 2112,50  | 1349,25  | 1777,25    | -763,25    | 1014,00  |
| $\bar{x}$ | 85,81    |          | 448,44     | -294,5     | 157,1    |
| s         | 159,1    |          | 642,55     | 444,86     | 438,55   |
| SE        |          |          | 242,86     | 168,15     | 165,76   |
| t         |          |          | 1,8464     | 1,7514     | 0,9476   |
|           |          |          | n.s.       | n.s.       | n.s.     |

Tab. III:

NFS-Konzentrationen im albuminhaltigen mit 200 mg% Glucose angereicherten KER-Puffer bei verschiedenen Lactatkonzentrationen nach 3-stündiger Inkubation.

Die NFS sind in  $\mu\text{Mol/l}$  angegeben. Erklärung der einzelnen Spalten wie Tab. I.

|           | I      | II     | III    | $\Delta_1$ | $\Delta_2$ | $\Delta$  |
|-----------|--------|--------|--------|------------|------------|-----------|
|           | 598,50 | 623,75 | 608,25 | 25,25      | - 15,50    | 9,75      |
|           | 595,50 | 720,25 | 682,00 | 124,75     | - 38,25    | 86,50     |
|           | 522,25 | 572,00 | 686,75 | 49,75      | 114,75     | 164,50    |
|           | 540,25 | 650,25 | 862,00 | 110,00     | 211,75     | 321,75    |
|           | 785,50 | 997,75 | 940,00 | 212,25     | - 57,75    | 154,50    |
|           | 743,75 | 739,25 | 828,25 | - 4,50     | 89,00      | 84,50     |
|           | 517,25 | 738,00 | 713,50 | 120,75     | - 24,50    | 96,25     |
| $\bar{x}$ | 614,0  |        |        | 91,18      | 39,93      | 131,11    |
| s         | 102,33 |        |        | 67,86      | 92,89      | 91,11     |
| SE        |        |        |        | 25,64      | 35,11      | 34,4      |
| t         |        |        |        | 3,63       | 1,1371     | 3,82      |
|           |        |        |        | p < 0,01   | n.s.       | p < 0,005 |

Tab. IV

Glyzerinkonzentrationen im albuminhaltigen und mit 200 mg% Glucose angereicherten KBR-Puffer bei verschiedenen Lactatkonzentrationen nach 3-stündiger Inkubation.

Die Glyzerinkonzentration ist in  $\mu\text{Mol/l}$  angegeben. Erklärung der einzelnen Spalten wie Tab. I.

|           | I        | II     | III    | $\Delta_1$ | $\Delta_2$ | $\Delta$ |
|-----------|----------|--------|--------|------------|------------|----------|
|           | - 18,5   | - 48,0 | - 72,7 | - 66,5     | - 24,7     | - 91,2   |
|           | - 95,2   | - 90,4 | - 31,1 | 4,8        | 59,3       | 64,1     |
|           | - 76,1   | -118,1 | -112,2 | - 42,0     | 5,9        | - 36,1   |
|           | -110,7   | - 88,4 | - 98,8 | 22,3       | - 10,4     | 11,9     |
|           | - 3,9    | - 6,5  | - 86,3 | - 2,6      | - 79,8     | - 82,4   |
|           | - 28,6   | -121,2 | - 87,8 | - 92,6     | 33,4       | - 59,2   |
|           | 24,7     | 65,8   | 27,4   | 41,1       | - 38,4     | 2,7      |
| $\bar{x}$ | -38,7571 |        |        | -19,3571   | - 7,8142   | -27,1714 |
| s         | 51,2409  |        |        | 45,2839    | 42,7622    | 52,1053  |
| SE        | 19,3676  |        |        | 17,1160    | 16,1629    | 19,6943  |
| t         |          |        |        | 1,1        | 0,4834     | 1,4      |
|           |          |        |        | n.s.       | n.s.       | n.s.     |

Tab. V:

Glucoseumsatz nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen und mit 200 mg% Glucose angereicherten KBR-Puffer bei verschiedenen Lactatkonzentrationen.

Die Glucosekonzentrationen sind in mg% angegeben. Erklärung der einzelnen Spalten wie Tab. I.

| I         | II       | III     | $\Delta_1$  | $\Delta_2$ | $\Delta$    |
|-----------|----------|---------|-------------|------------|-------------|
| 0,67920   | 0,84643  | 1,0440  | 0,1672      | 0,1985     | 0,3657      |
| -1,59095  | -1,14570 | -1,1761 | 0,4453      | -0,0304    | 0,4149      |
| 0,47430   | 0,45450  | 0,3383  | -0,0198     | -0,1162    | -0,1360     |
| -1,53680  | -1,69830 | -0,9202 | -0,1615     | 0,7781     | 0,6166      |
| 0,17785   | 0,55290  | 0,3916  | 0,37505     | 0,0014     | 0,37645     |
| $\bar{x}$ |          |         | 0,2258      | 0,1662     | 0,3275      |
| s         |          |         | 0,1664      | 0,3228     | 0,2489      |
| SE        |          |         | 0,0744      | 0,1448     | 0,1113      |
| t         |          |         | 3,0349      | 1,1517     | 2,9424      |
|           |          |         | $p < 0,025$ | n.s.       | $p < 0,025$ |

Tab. VI:

Änderungen des Glykogengehaltes von Rattenzwerchfelhälfen nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen mit 200 mg% Glucose angereicherten KBR-Puffer bei steigenden Lactatkonzentrationen.

Die Zahlen sind Mittelwerte aus je einem Versuchsansatz mit 12 Zwerchfelhälfen. Spalte I, II und III zeigen die Zunahme (positive Zahlen) bzw. Abnahme (negative Zahlen) des Glykogengehalts in mg%/g Muskelgewebe im lactatfreien (Spalte I) und im lactathaltigen Medium (Spalte II mit 50 mg%, Spalte III mit 100 mg% Lactat).  $\Delta_1, \Delta_2$  und  $\Delta$  sind die Differenzen II - I, III - II und III - I und bedeuten die durch Lactatzusatz bewirkten Veränderungen des Glykogengehaltes der Muskelstücke.

| I         | II      | III    | $\Delta_1$ | $\Delta_2$ | $\Delta$ |
|-----------|---------|--------|------------|------------|----------|
| 55,20     | 13,50   | 7,40   | 41,7       | 6,1        | 47,8     |
| 43,80     | - 11,00 | -17,70 | 54,8       | 6,7        | 60,7     |
| 14,33     | 19,31   | -35,00 | - 5,0      | 54,3       | 49,3     |
| 45,40     | - 98,60 | -10,20 | 144,4      | - 88,4     | 55,6     |
| 59,28     | - 17,27 | 29,80  | 76,6       | - 47,1     | 29,4     |
| - 7,25    | 29,30   | 16,96  | - 36,6     | 12,3       | -24,3    |
| -22,59    | - 15,24 | -92,38 | - 7,4      | 77,2       | 69,8     |
| 35,63     | 254,86  | - 9,82 | -219,3     | 264,7      | 45,4     |
| 69,13     |         | 43,27  |            |            | 25,8     |
| $\bar{x}$ |         |        | 6,2        | 35,7       | 39,9     |
| s         |         |        | 100,41     | 99,39      | 26,21    |
| SE        |         |        | 35,50      | 35,14      | 8,7      |
| t         |         |        | 0,1732     | 1,0166     | 4,5712   |

# Tab. VII

Lactatumsatz nach 3-stündiger Inkubation im albuminhaltigen KBR-Puffer, der mit 0, 50 und 100 mg% Lactat angereichert war.

Die Lactatkonzentrationen sind in mg% angegeben. Erklärungen der einzelnen Spalten wie Tab. I.

Die Ergebnisse der Lactatbestimmung wurden rechnerisch nicht verwertet, da bei den hohen Lactatkonzentrationen schon ein kleiner Fehler eine große Abweichung zur Folge hat.

## DISKUSSION

Die gewaltige Muskelmasse, die beim Menschen etwa 30 - 40 % des Körpergewichts ausmacht, hat zwei Möglichkeiten, ihren Energiebedarf zu decken:

Die Verbrennung von Glucose und von Fett.

Zur Wahrung der geringen Kohlenhydratvorräte im Organismus, werden unter Ruhebedingungen im Muskel vorwiegend Fette verbrannt, was aus Messungen des RQ (2, 36, 56) und Untersuchungen mit markierten Fettsäuren bekannt ist (19, 21, 28). Messungen bei unseren in vitro-Untersuchungen zeigten, daß nach einer Vorinkubation von 30 min keinerlei Glykogen mehr im Muskel vorhanden ist. Infolgedessen konnten wir im glucosefreien Medium sicher sein, daß die Versuche praktisch kohlenhydratfrei durchgeführt wurden.

Beachtet man die Tatsache, daß pro Molekül Glyzerin 3 Moleküle NFS bei der Spaltung von Triglyceriden freigesetzt werden müssen, so zeigte sich, daß unter basalen Bedingungen ein Großteil der NFS bei der Triglyceridspaltung nicht im Medium erschienen (604 : 248 anstatt 604 : 1812), d.h. über 80 % der aus der TG-Spaltung freigegebenen NFS erschienen nicht im Medium, sondern wurden im Muskel zurückgehalten. Es liegt nahe, daß zumindest ein Teil dieser zurückgehaltenen NFS zur Aufrechterhaltung des Ruhestoffwechsels verwendet werden. Tatsächlich konnten NEPTUNE et al. (48) durch intramuskuläre Lipidbestimmung nachweisen, daß die Atmung des Rattenzwerchfells im substratfreien Medium viele Stunden durch Verbrennung muskeleigener Fettsäuren aufrechterhalten werden kann.

Befindet sich zusätzlich Glucose im Inkubationsmedium, so werden sogar 90 % der anfallenden Fettsäuren zurückbehalten. Dieser zusätzliche NFS-Verbrauch könnte sich nur aus einer erhöhten Reveresterungsrate der NFS im Sinne des Randle-Mechanismus erklären (49). D.h. aus dem Glucoseabbau wird vermehrt alpha-Glycerophosphat freigesetzt, das sich mit freien Fettsäuren erneut zu Triglyceriden aufbaut. SCHÖNFELD (51) fand bei ähnlichen Inkubationsversuchen ebenfalls einen erhöhten NFS-Verbrauch nach Glucosezusatz, der allerdings auch bei ihm nicht signifikant war.

Während einer Muskelarbeit steigt der Energiebedarf beträchtlich an. Nach einer vorübergehenden Umschaltung auf eine vorwiegende Kohlenhydratverbrennung, verbrennt die Muskulatur bei länger dauernder Arbeit erneut hauptsächlich NFS (1, 4, 6, 19, 21, 22, 26, 28, 33, 36, 37, 38, 42). Bei jeder körperlichen Arbeit werden erhebliche Mengen Lactat vom arbeitenden Muskel produziert. Bei schwerer körperlicher Arbeit kann der Milchsäurespiegel im Blut des Menschen auf über 100 mg% ansteigen. Die von uns gewählten Lactatkonzentrationen kommen also tatsächlich auch in vivo vor (41, 53). Um also gewissermaßen ein Milieu zu erzeugen, wie es bei einer schweren Muskelarbeit entsteht, inkubierten wir die Muskelstücke in verschiedenen Lactatkonzentrationen.

Zusatz von Milchsäure zum Inkubationsmedium bewirkte eine weitere Verschiebung im Verhältnis Glycerin/NFS-Freisetzung.

Bei einer Konzentration von 50 mg% Lactat im albuminhaltigen KBR-Puffer konnten wir eine signifikant gesteigerte Lipolyse feststellen. Als Maß für die Lipolyse diente uns der Glycerinspiegel im Inkubationsmedium. Die dabei anfallenden freien Fettsäuren wurden dagegen im Muskel zurückbehalten (siehe Abb. I).

Eine weitere Erhöhung der Lactatkonzentration auf 100 mg% erbrachte sogar trotz anhaltend signifikant gesteigerter Lipolyse einen zusätzlichen signifikanten Einstrom von NFS in die Muskulatur (Abb. II).

Bei gleichzeitigem Glucosezusatz waren die Verhältnisse in etwa die gleichen. Eine lactatinduzierte Aufnahme von Fettsäuren in die Muskulatur konnte zwar diesmal nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde auch hier, gemessen an der vermehrten Glycerinfreisetzung, ein höher Prozentsatz von frei werdenden Fettsäuren in der Muskulatur zurückbehalten (Abb. I).

Die Änderungen des Glycerinspiegels im Medium konnten uns deswegen als Maß für die Lipolyse dienen, weil das bei der Hydrolyse der Triglyceride entstehende Glycerin in der Muskelzelle nicht weiter verstoffwechselt werden kann. In der Muskulatur fehlt das hierzu nötige Enzym Glycerokinase (54). Glycerin diffundiert daher aus der Zelle in

die umgebende Flüssigkeit, wo es gemessen werden kann.

Dagegen ist der im Medium anzutreffende NFS-Spiegel eine Resultante aus der Lipolyse einerseits und Verbrauch durch weitere Metabolisierung andererseits. Aus unserer Versuchsanordnung läßt sich nicht ablesen, welchen der möglichen Wege der Metabolisierung die NFS einschlagen.

Möglich ist sowohl eine NFS-Oxidation als auch eine Reveresterung mit alpha-Glycerophosphat, das aus Lactat bei der Gluconeogenese, sowie bei der Glykogenolyse entstehen kann.

ISSEKUTZ fand 1966 (39) bei in vivo Versuchen an trainierten und untrainierten Hunden, jeweils verbunden mit hohen Lactatspiegeln, einen geringeren NFS-Umsatz und eine geringere NFS-Oxidation, die er sich aus einer höheren Reveresterungsrate erklärte. Andererseits sprechen Befunde von GOURLEY u. FISHER (1963) für eine vermehrte NFS-Oxidation nach Lactatzugabe (27). Diese Autoren inkubierten Froschmuskeln zu Lactatmedium, dessen Konzentration dem unseren sehr ähnlich waren. Der Sauerstoffverbrauch stieg bei den im Lactatmedium inkubierten Muskeln im Vergleich zu den Kontrollen auf bis zu 90 % an. Selbst unter der Voraussetzung, daß das aufgenommene Lactat total oxidiert wurde, verblieb eine Sauerstoffluxuskonsumption von etwa 70 - 80 %, die den Autoren unerklärlich war.

Wir können diesen ungeklärten  $O_2$ -Mehrverbrauch zwanglos durch eine vermehrte Fettoxidation erklären, da im Lactatmedium trotz nachgewiesener Triglyceridspaltung entweder nur ein geringer Anteil von NFS im Medium erschien (mit 50 mg% Lactat) oder sogar NFS aus dem Medium in die Muskulatur aufgenommen wurde (100 mg% Lactat im Medium).

Vergleicht man außerdem mit in vivo Versuchen, so fällt auf, daß Versuche mit markierten Fettsäuren ergeben haben, daß während muskulärer Arbeit, also zur Zeit erhöhter Lactatproduktion, die NFS-Oxidation größer ist als die gleichzeitige Fettsäureaufnahme.

Die Fettsäureoxidation muß also bei muskulärer Arbeit zum Teil aus muskeleigenen Reserven bestritten worden sein (56). Tatsächlich enthält die Muskulatur neben Glykogenreserven nicht unbedeutende Tri-

glyceriddepots (44).

In vivo Versuche an Hunden von ISSEKUTZ und PAUL (1968) (38) zeigten, daß die Energieversorgung während muskulärer Arbeit nahezu ausschließlich durch Fettverbrennung gedeckt wurde. Nur die Hälfte dieser verbrannten Fettsäuren entstammten aber dem Blut. Die andere Hälfte wurde aus der NFS-Oxidation muskeleigener Fettdepots gedeckt.

Obwohl unsere Untersuchung an ruhenden Muskeln im Lactatmedium nicht mit einer arbeitenden Muskulatur in vivo zu vergleichen sind, ähneln sich die Ergebnisse erstaunlich.

Vergleichen wir unser Modell, bei dem Lactat künstlich zugeführt wurde, mit der Lactatproduktion während einer Muskelarbeit, so sieht man in jedem Falle eine vermehrte Bereitstellung von Fettsäuren.

Darüberhinaus ist tatsächlich eine lactatbedingte vermehrte Fettoxidation wahrscheinlich (27).

In vivo kommt es initial während einer Muskelarbeit, trotz des Mehrbedarfs an energiereichen Substraten zu einem arteriellen NFS-Abfall bei gleichzeitig vermehrter Glycerinproduktion (4, 11, 12, 13, 14, 34). In vitro bewirkte Lactatzusatz zum Medium eine vermehrte Glycerinfreisetzung, die sich mit in vivo Befunden deckt. Der initiale NFS-Abfall kann durch zwei Ursachen erklärt werden. Erstens durch ein vermindertes Angebot aus dem Fettgewebe und zweitens durch eine vermehrte Ausschöpfung durch die Muskulatur. Beides entspricht Effekten, die nach unseren Ergebnissen von Lactat bewirkt werden können, denn schon in früheren Versuchen konnten wir in vitro eine deutliche lipolysehemmende Wirkung des Lactat am Rattenfettgewebe nachweisen (16).

Unsere jetzige Versuchsreihe erbrachte außer der intramuskulären NFS-Produktion einen signifikanten Einstrom in das Muskelgewebe unter Lactateinfluß, was einer vermehrten Ausschöpfung entspricht.

Dieser NFS-Einstrom in den Muskel fehlte bei einer zweiten Versuchsreihe, bei der dem Medium zusätzlich Glucose zugegeben war. Diese Versuche sollten allerdings nicht mit in vivo Verhältnissen verglichen werden. Glucose- und Fettsäureverbrauch können sich in unserem

System im Sinne des RANDLE-Mechanismus gegenseitig beeinflussen (49).

In vivo befindet sich aber das Muskelgewebe während des initialen NFS-Abfalls in einer Glucosemangelsituation. Wie wir wissen, stammt die enorme Lactatproduktion aus der anfangs gesteigerten Glykogenolyse (14).

Das Schlüsselenzym der Glykogenolyse, die PFK, muß dazu in seiner aktiven Form vorliegen (25, 30, 31, 33, 55). Diese jedoch setzt die Aktivität der Hexokinase herab, wie aus den Arbeiten von PETTE hervorgeht.

Eine Inaktivität der Hexokinase macht aber eine Glucoseverwertung durch die Muskelzelle unmöglich, was einer Glucosemangelsituation gleichkommt.

Erst nach etwa 5 min dauernder Arbeit kommt es in vivo zu einer Glucoseverwertung. Gleichzeitig beobachten wir nun sogar ein Ansteigen der NFS-Spiegel im Blut über die Ausgangswerte. Bei Beginn der Ruhephase kommt es darüberhinaus, während der Lactatspiegel noch erhöht ist, zu einer gegenüber Ruhebedingungen weit gesteigerten Glykogensynthese (7, 8, 33), bei weiterem Anstieg des Glucoseeinstroms (25, 41, 50).

Diese Beobachtungen zeigen gute Übereinstimmung mit unseren in vitro-Ergebnissen im glucosehaltigem Medium.

Wir fanden eine signifikante lactatbedingte Glykogenneubildung eine nicht signifikante Glucoseaufnahme, sowie eine NFS-Abgabe durch das Gewebe. Eine Anregung der Glykogensynthese durch Lactat konnte auch von anderen Autoren beobachtet werden (3, 5, 27).

Trotz dieser guten Übereinstimmung zwischen unserem Modell und in vivo-Verhältnissen bleibt die Frage offen, ob Lactat am ruhenden Gewebe tatsächlich alle Veränderungen eines arbeitenden Muskels nachzuahmen vermag.

Sicher spielen auch andere Faktoren eine Rolle. Besonders während längerer Arbeit gewinnen hormonelle Faktoren zunehmend an Bedeutung. Es ist bekannt, daß STH, ACTH und Katecholamine während Arbeit ansteigen (18, 29, 51).

Ob diese Hormone im Muskelstoffwechsel eine Rolle spielen, muß noch dahingestellt bleiben. Es sprechen allerdings eine Reihe von Befunden für einen ausschließlich lokalen Effekt und nicht für eine systemische Wirkung, wie man sie bei Einflußnahme von Hormonen erwarten müßte: SANDERS et al. (50) fanden nämlich, daß die Glucoseaufnahme nur am Arbeitsbein, nicht aber am Ruhebein erhöht war.

BERGSTRÖM und HULTMAN (1966) (8) beobachteten bei Ergometerversuchen, bei denen jeweils nur ein Bein belastet wurde, eine überschießende Glykogenresynthese nach der Arbeit ebenfalls nur am Arbeitsbein, nicht jedoch am Ruhebein. Diese eindrucksvollen Befunde lassen sich nicht durch eine systemische hormonelle oder humorale Steuerung erklären, sondern sprechen für einen lokalen, von der Arbeitsmuskulatur produzierten Faktor, der diese Stoffwechselveränderungen zur Folge hat.

Auch GOLDSTEIN (1965) diskutierte einen lokalen Faktor, der für die Glucoseaufnahme verantwortlich ist, der sich selbst reguliert und durch Muskelarbeit aktiviert wird (24).

Als quantitativ wichtigste lokale Veränderung bei Muskelarbeit findet sich ein Anstieg der Milchsäurekonzentration im Blut um den Faktor 50, sowie ein Absinken des  $pO_2$ . Die  $pO_2$ -Veränderung ließen wir bei unseren Untersuchungen unberücksichtigt. Die von uns verwendeten Lactatkonzentrationen können im venösen Blut bei Muskelarbeit durchaus erreicht werden (41, 53). Es ist wahrscheinlich, daß die Lactatkonzentration im Gewebe sogar noch über den im venösen Blut gemessenen Werten liegt.

ISSEKUTZ sah schon 1962 einen Zusammenhang zwischen dem Absinken der NFS und dem bei Arbeit vermehrt anfallenden Lactat. Zahlreiche tierexperimentelle Studien erbrachten immer wieder eine negative Korrelation zwischen Lactat und dem NFS-Spiegel im Blut (23, 35, 36, 46). Zudem verursachen Lactatinfusionen beim Hund (23, 35) und am Menschen (DIETERLE P. unveröffentl.) ein ähnliches Verhalten der Fettsäuren, wie es auch durch Muskelarbeit verursacht werden kann.

COBBS und JOHNSON (13) fanden bei Untersuchungen einen höheren Lactatanstieg bei den untrainierten Personen mit einem deutlicheren Abfall

der freien Fettsäuren. Schließlich konnten wir in früheren in vitro-Versuchen am isolierten Rattenfettgewebe eine deutliche dosisabhängige Lipolysehemmung durch Lactat nachweisen (16).

Dagegen fand BÜHRING bei elektrischer Reizung isolierter Muskelstücke eine erhöhte Substratoxidation ohne Erhöhung des Lactatspiegels, die er als NFS-Oxidation deutete. Allerdings wurde bei der Auswertung dieser Versuche die Glykogenolyse als Energielieferant nicht berücksichtigt (10). ISSEKUTZ konnte 1966 zeigen (39), daß beim trainierten Hund bei einem relativ geringen Lactatanstieg im Blut der NFS-Umsatz anstieg (wobei sich der NFS-Plasmaspiegel nicht verändern mußte) und mit ihm die  $\text{CO}_2$ -Produktion aus NFS.

Dagegen lag beim untrainierten Hund der Lactatspiegel höher, aber der NFS-Umsatz und die NFS-Oxidation sanken. ISSEKUTZ erklärt dies durch eine höhere Reveresterungsrate bei lokalem Sauerstoffmangel.

Danach häuft sich sowohl bei zu niedrigem  $\text{pO}_2$ , als auch nach Lactatinfusionen  $\text{DPNH}_2$  an.  $\text{DPNH}_2$  gibt seinen Wasserstoff ab, um vermehrt Glycerophosphat zu bilden. alpha-Glycerophosphat kann mit NFS wieder zu Triglyceriden reverestert werden.

Ferner erhebt sich die Frage, ob die dargestellten Effekte unmittelbar von Lactat verursacht sind oder ob Lactat lediglich einen vermittelnden Faktor darstellt. Insulin dürfte hier keine Rolle spielen. Auch am pankreatektomierten Tier findet sich nach ISSEKUTZ eine negative Lactat/NFS-Korrelation (39, 45), lediglich um die antilipolytische Wirkung des Insulin parallel verschoben.

Somit ergeben sich aus unseren Untersuchungen Hinweise, daß das von der arbeitenden Muskulatur produzierte Lactat nicht nur ein Endprodukt der Glykolyse darstellt, sondern möglicherweise auch wichtige Funktionen in der Substratversorgung erfüllt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde im in vitro-System die Änderung des Substratverbrauchs von Rattenzwerchfellen unter Zugabe von Milchsäure in steigenden Konzentrationen im glucosefreien und glucosehaltigen Medium.

Gemessen wurde der Gehalt des Inkubationsmediums an NFS, Glyzerin, Glucose und Lactat vor und nach der Inkubation der Zwerchfelle. Ein Teil der Muskelstücke wurde jeweils benützt, um den Glykogengehalt zu Beginn und am Ende des Versuchs zu messen. Alle Substrate wurden enzymatisch bestimmt. Lactat führte am ruhenden Muskel zu einer signifikant gesteigerten Lipolyse, gemessen am Glyzerin. Trotz dieser vermehrten Glyzerinfreisetzung erschienen die dabei freiwerdenden Fettsäuren nicht im Medium, sondern wurden im Gegenteil bei hohen Lactatkonzentrationen aus dem Medium in die Muskulatur aufgenommen.

Enthielt das Medium Glucose, so kam es unter steigender Lactatkonzentration zu einer vermehrten Glucoseaufnahme und zu einer signifikanten Glykogenneusynthese.

Überträgt man die Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse, so hat Lactat als Stoffwechselprodukt während einer Muskelarbeit möglicherweise die Aufgabe, den vermehrten Substratbedarf zu regulieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 AHLBORG, B., J. Bergström, L.G. Ekelund and E. Hultman:  
Muscle glycogen and muscle elektrolytes during  
prolonged physical exercise.  
Acta Physiol.Scand. 70, 129 (1967)
- 2 BALTZAN, M.A., R. Andres, G. Cader and K.L. Zierler:  
Heterogenity of forearm metabolism with special  
reference to free fatty acids.  
J.clin.Invest. 41, 116 (1962)
- 3 BÄR, U., M.C. Blanchaer:  
Glycogen and CO<sub>2</sub> production from glucose and lac-  
tate by red and white skeletal muscle.  
Amer. J.Physiol. 209: 905 (1965)
- 4 BASU, A., R. Passmore and J.A. Strong:  
The effect of exercise on the level of non-ester-  
fied fatty acids in blood.  
Quart.J.exper.Physiol. 45, 312 (1960)
- 5 BENDALL, J.R., A.A. Taylor:  
The Meyerhof quotient and the synthesis of gly-  
cogen from lactate in frog and rabbit muscle.  
A reinvestigation.  
Biochem.J. 118: 887 (1970)
- 6 BERGSTRÖM, J., L. Hermansen, E. Hultman and B. Saltin:  
Diet, muscle glycogen and physical performance.  
In: Studies on muscle metabolism of glycogen and  
active phosphate in man with special reference to  
exercise and diet.  
Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl. 94, 19 (1967)
- 7 BERGSTRÖM, J., and E. Hultman:  
The effect of exercise on muscle glycogen and  
elektrolytes in normals.  
Scand.J.Clin.Lab.Invest. 18, 16 (1966)
- 8 BERGSTRÖM, J. and E. Hultman:  
Muscle glycogensynthesis after exercise:  
an enhancing factor localized to the muscle cells  
in man.  
Nature (Lond.) 210, 309 (1966)

- 9 BOEHRINGER Informationen:  
Glucose Test. Enzymatische Bestimmung von D-Glucose mit Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- 10 BÜHRING, H. und F. Hockemeyer:  
Energienstoffwechsel des Muskels. Die Oxydation von Fettsäuren und Glucose sowie die Milchsäurebildung im ruhenden und arbeitenden Skeltetmuskel in vitro.  
Biochem.Z. 346, 50 (1966)
- 11 CARLSON, L.A., L.G. Ekelund and L. Orö:  
Studies on blood lipids during exercise.  
IV. Arterial concentration of plasma free fatty acids and glycerol during and after prolonged exercise in normal man.  
J.Lab.Clin.Med. 61, 724 (1963)
- 12 CARLSON, L.A. and B. Pernow:  
Studies on blood lipids during exercise.  
II. The arterial plasma free fatty acid concentration during and after exercise and its regulation.  
J.Lab.Clin.Md. 58, 673 (1961)
- 13 COBB, L.A. and W.P. Johnson:  
Hemodynamic relationships anaerobic metabolism and plasma free fatty acids during prolonged, strenuous exercise in trained and untrained subjects.  
J.clin.Invest. 42, 800 (1963)
- 14 DIETERLE, C.:  
Zum Muskelstoffwechsel: Substrataufnahme beim Gensunden unter Grundumsatzbedingungen und bei kurzzeitiger Belastung.  
Inaug.Diss. an der Ludwig-Maximilians-Universität München (1970)
- 15 DIETERLE, P., Chr. Wülfert-Heldrich, J. Henner und K. Schwarz:  
Erfahrungen mit einer kolorimetrischen Methode zur Bestimmung der nicht veresterten Fettsäuren im Serum.  
Z.klin.Chem. 6, 153 (1968)

- 16 DIETERLE, P., C. Dieterle, P. Bottermann und K. Schwarz:  
In vitro Versuche zur antilipolytischen Wirkung  
von Milchsäure.  
Diabetologia, 5, 238 - 242 (1969)
- 17 DUNCOMBE, W.G.: The colorimetric determination of nonesterified  
fatty acids in plasma.  
Clin.Chim.Acta, 9, 122 (1964)
- 18 EULER, von, L.S. and S. Hellner:  
Excretion of noradrenaline and adrenaline in mus-  
cular work.  
Acta physiol.scand. 26, 183 (1952)
- 19 FREDRICKSON, D.S. and R.S. Gordon:  
The metabolism of albumin-bound C<sup>14</sup>-labeled un-  
esterified fatty acids in normal human subjects.  
J.clin.Invest. 37, 1504 (1958)
- 20 FRIEDBERG, S.J., W.R. Harlan, D.L. Trost and E.H. Estes:  
The effects of exercise on the concentration and  
turnover of plasma nonesterified fatty acids.  
J.clin.Invest. 39, 215 - 220 (1960)
- 21 FRIEDBERG, S.J., D.L. Trout, M.D. Bagdonoff and J.H. Estes:  
The characteristics of the peripheral transport  
of C<sup>14</sup>-labeled palmitic acid.  
J.clin.Invest. 39, 1511 (1960)
- 22 FRITZ, I.B., D.G. Davis, R.H. Holtrop and H.Dundee:  
Fatty acid oxydation by skeletal muscle during  
rest and activity.  
Amer.J.Physiol. 194, 379 (1958)
- 23 GOLD, M., H.J. Miller, B. Issekutz and J.J. Spitzer:  
Effect of exercise and lactic acid infusion on  
individual free fatty acids of plasma.  
Amer.J.Physiol. 205, 902 (1963)
- 24 GOLDSTEIN, M.S.: Muscular exercise and subsequent glucose utilisation.  
In B.S. LEIBEL and G.A. WRENSHALL: "On the  
nature and treatment of Diabetes." Amsterdam: Ex-  
cerpta med. Foundation 1965
- 25 GOLLNICK, P.D.: Exercise, adrenergic blockage and free fatty acid  
mobilization.  
Amer.J.Physiol. 213, 734 (1967)

- 26 GORDON, R.S.: Fatty acid in human blood plasma.  
II. The transport function of unesterified fatty acids.  
J.clin.Invest. 36, 810 (1957)
- 27 GOURLY, D.R.H., K.C. Fisher:  
The role of lactate in the stimulation of the oxygen consumption of frog muscle by insulin.  
Canad.J.Physiol.Pharm. 42, 139 (1964)
- 28 HAVEL, R.J., A. Naimark and C.F. Borchgrevink:  
Turnover rate and oxydation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise. Studies during continuous infusion of palmitate-1- $C^{14}$ .  
J.clin. Invest. 42, 1054-1063 (1963)
- 29 HÄGGENDAL, J.: An improved method for fluorimetric determination of small amounts of adrenaline and noradrenaline in plasma and tissues.  
Acta physiol.scand. 59, 242 (1963)
- 30 HELMREICH, E., S. Karparkin und C.F. Cori:  
Regulation of glycolysis in skeletal muscle. Control of glycogen metabolism.  
Ciba Found. Symb. London, Churchill Ltd. (1964)
- 31 HOFER, H.W. und D. Pette:  
Aktive und inaktive Form der Phosphofruktokinase des Kaninchenskelettmuskels.  
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 349, 1105 (1968)
- 32 HOHORST, H.: L-(+)-Lactat. Bestimmung mit Lactatdehydrogenase und DPN.  
In H.U. Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1962) S. 266
- 33 HULTMAN, E.: Studies on muscle metabolism of glycogen and active phosphate in man with special reference to exercise and diet.  
Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl. 94
- 34 ISSEKUTZ, B., W.M. Bortz, H.I. Miller and A. Wroldsen:  
Plasma free fatty acid response to exercise in obese humans.  
Metabolism, 16, 492 - 502 (1967)
- 35 ISSEKUTZ, B. and H. Miller:  
Plasma free fatty acids during exercise and the effect of lactic acid.  
Proc.Soc.exp.Biol. 110, 237 (1962)

- 36 ISSEKUTZ, B., H. Miller and K. Rodahl:  
Effect of exercise on free fatty acid metabolism  
of pancreatectomized dogs.  
Amer.J.Physiol. 205, 645 (1963)
- 37 ISSEKUTZ, B., H. Miller, P. Paul and K. Rodahl:  
Source of fat oxydation in exercising dogs.  
Amer.J.Physiol. 207, 583 (1964)
- 38 ISSEKUTZ, B., P. Paul, H. Miller and K. Bortz:  
Oxydation of plasma free fatty acids in lean and  
obese humans.  
Metabolism, 17, 62 (1968)
- 39 ISSEKUTZ, B., H. Miller and K. Rodahl:  
Lipid and carbohydrate metabolism during exercise.  
Fed.P. 25, 1415 (1966)
- 40 KEMP, A., A.J.M. Kits van Heijningen:  
A colorimetric micro-method for the determination  
of glycogen in tissues.  
Biochem.J. 56: 646 (1954)
- 41 KEUL, J., E. Doll und D. Keppler:  
Zum Stoffwechsel des Skelettmuskels. I. Glucose,  
Lactat, Pyruvat und Freie Fettsäuren im arteriellen  
und venösen Blut der arbeitenden Muskulatur  
bei Hochleistungssportlern.  
Pflügers Arch. 301, 198 (1968)
- 42 KRAMER, K., W. Quensel und K.E. Schäfer:  
Untersuchungen über den Muskelstoffwechsel des  
Warmblüters.  
IV. Beziehungen zwischen Sauerstoffaufnahme und  
Milchsäureabgabe des Muskels während Tätigkeit.  
Pflügers Arch. 241, 730 (1939)
- 43 KREUTZ, F.H.: Enzymatische Glyzerinbestimmung.  
Klin.Wschr. 7: 362 (1962)
- 44 MASORO, E.J.: Skeletal muscle lipids.  
J.biol.Chem. 242: 362 (1967)
- 45 MILLER, H.J., B. Issekutz and K. Rodahl:  
Effect of the exercise on the metabolism of fatty  
acids in the dog.  
Amer.J.Physiol. 205, 167 (1963)

- 46 MILLER, H.J., B. Issekutz, P. Paul and K. Rodahl:  
Effect of lactic acid on plasma free fatty acids  
in pancreatectomized dogs.  
Amer.J.Physiol. 207, 1126 - 1230 (1964)
- 47 MILTON W. Slein:D-Glucose Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-  
6-Phosphat-Dehydrogenase.  
In: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen  
Analyse, 117 (1962)
- 48 NEPTUNE, E.M., H.C. Sudduth and D.R. Foreman:  
Labile fatty acids of rat diaphragm muscle and  
their possible role as the major substrate for  
maintenance of respiration.  
J.biol.Chem. 234, 1659 - 1660 (1959)
- 49 RANDLE, P.Jr., C.N. Hales, P.B. Garland and E.A. Newsholme:  
The glucose fatty acid cycle.  
Lancet, 785, 1963/I
- 50 SANDERS, Ch.A., G.E. Levison, W.H. Abelman und N.Freinkel:  
Effect of exercise on the periphal utilization of  
glucose in man.  
New.Engl.J.Med. 221, 220 (1964)
- 51 SCHÖNFELD, M.D. and David M. Kipnis, M.D.:  
Glucose Fatty Acid Interactions in the Rat Dia-  
phragma in Vivo.  
Diabetes Vol. 17, Nr. 7, 422 - 26 (1968)
- 52 SPITZER, J.J. and M. Gold:  
Free fatty acid metabolism by skeletal muscle.  
Amer.J.Physiol. 206, 159 - 162 (1964)
- 53 ULMER, W.T. und B. Rasche:  
Milchsäure und Brenztraubensäure Konzentration im  
Armvenenblut bei gesunden Versuchspersonen unter  
Ruhebedingungen, bei venöser Stauung und bei Ar-  
beitsbelastung.  
Z.ges.exp. Med. 145, 185 (1968)
- 54 WIELAND, O., M. Suyter:  
Glycerokinase; Isolierung und Eigenschaften des  
Enzyms.  
Biochem.Z. 329, 320 (1957)

- 55 WILLIAMS, R.H. and J.W. Ensink:

Secretion, fates and actions of insulin and related products.

The Banting memorial lecture 1966.

Diabetes, 15, 623 (1966)

- 56 ZIERLER, K.L. and R. Andres:

Carbohydrate metabolism in intact skeletal muscle in man during the night.

J.clin.Invest. 35, 991 (1956)

## LEBENS LAUF

Am 28. März 1946 wurde ich in Ichenhausen, Kreis Günzburg, als Sohn meiner Eltern Rudolf Banholzer und Nadja Banholzer, geb. Sablisskaja, geboren.

1950 übersiedelten wir nach München.

Hier besuchte ich von 1952 bis 1956 die Volksschule am Dom-Pedro-Platz.

Mit 10 Jahren trat ich in die Rupprecht-Oberrealschule ein, wo ich 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1965/66 begann ich das Medizinstudium an der Universität München. Dort bestand ich 1966 das Vorphysikum, 1968 das Physikum und im Sommer 1971 das Staatsexamen.





